

# PG13 残留 DNA 检测试剂盒（qPCR 荧光探针法）说明书

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

Cat. No. HG-PG001

## 产品简介

PG13 细胞系是由小鼠胚胎成纤维细胞（NIH/3T3）整合莫洛尼氏白血病病毒（MLV）表达载体和长臂猿白血病病毒（GALV）胞膜蛋白基因改造而获得的。PG13 细胞作为一种包装细胞目前主要应用于细胞产品（如 CAR-T/TCR-T 细胞等）的开发。因此相关生物制品需要对其进行 PG13 细胞 DNA 残留的含量进行检测。

本试剂盒配套有 PG13 DNA 定量参考品可快速准确定量检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中 PG13 残留 DNA。

配套我司样品前处理试剂盒（货号为 HG-CL100）进行样品的前处理。

检测范围：3 fg/μL ~ 3 × 10<sup>5</sup> fg/μL

## 规格

100 Reactions

## 试剂盒组成

表 1 试剂盒组分及储存条件

组 分	规格	储存条件
PG13 DNA 定量参考品 (30ng/μL)	50μL × 1 管	-20°C
PG13 Primer&Probe Mix	550μL × 1 管	
2x qPCR Reaction Buffer	1.6mL × 1 管	
DNA 稀释液	1.5m × 3 管	

## 储存条件及有效期

储存条件见上表，有效期 12 个月。开封后未使用完的试剂盒注意仍在规定储存条件下保存。

## 适用机型

包括但不限于 ABI7500、BioRad CFX96、博日 FQD-96A、Roche Light Cycler 480 等实时定量荧光 PCR 仪器。

## 需要准备的耗材与设备：

实验前请准备好下列耗材与设备：

- ◆ 1.5mL 或 2mL 无菌低吸附离心管
- ◆ 离心机
- ◆ 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- ◆ 震荡器
- ◆ 1000μL, 200μL, 10μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- ◆ 各规格移液器（如 1000μL, 200μL, 10μL, 2.5μL 等）
- ◆ 荧光定量 PCR 仪
- ◆ 磁力架
- ◆ 水浴锅 / 金属浴

## 实验步骤

### 一、样品前处理

详见我司样品前处理试剂盒（货号为 HG-CL100）操作说明书。

### 二、qPCR 操作步骤

#### 1. 定量参考品及 NTC/NCS 的制备

1.1 定量参考品：取出 PG13 DNA 定量参考品、DNA 稀释液置于冰上融化；待完全融化后，轻微振荡混匀，瞬时离心；

1.2 取 7 支干净的 1.5mL 离心管，分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6；

1.3 标准品稀释过程如下表：

表 2. 标准品稀释过程

标准品代号	稀释体积	浓度 (fg/μL)
ST0	10μL PG13 DNA 定量参考品 + 90μL DNA 稀释液	$3 \times 10^6$
ST1	10μL ST0 + 90μL DNA 稀释液	$3 \times 10^5$
ST2	10μL ST1 + 90μL DNA 稀释液	$3 \times 10^4$
ST3	10μL ST2 + 90μL DNA 稀释液	$3 \times 10^3$
ST4	10μL ST3 + 90μL DNA 稀释液	$3 \times 10^2$
ST5	10μL ST4 + 90μL DNA 稀释液	$3 \times 10^1$
ST6	10μL ST5 + 90μL DNA 稀释液	$3 \times 10^0$

1.4 NTC 的制备：100uL DNA 稀释液；

1.5 NCS 的制备：取 100uL DNA 稀释液与样品同时进行前处理，纯化洗脱后的产物即为 NCS；

1.6 加标回收 ERC：建议 90uL 样品 +10uL ST3，也可根据实际情况按照其他方式制备。

#### 2. q-PCR 反应液的制备和加样

2.1 根据所需检测的标准样品和待测样品数量（一般做 3 个复孔），计算所需孔数：

$$\text{反应孔数} = (\text{6 个浓度梯度的标曲} + \text{2 个阴性对照 NTC 和 NCS} + \text{待测样品}) \times 3$$

2.2 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR Mix 总量：

$$\text{qPCR Mix} = (\text{反应孔数} + \text{2 或 3}) \times 20\mu\text{L} \quad (\text{2 或 3 为操作损失量})$$

2.3 将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 3 所示配制 qPCR Mix。

表 3. qPCR Mix 配制表

组分	单个反应量 (μL)
2× qPCR buffer	15
PG13 Primer&Probe Mix	5
总体积	20

3. 将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 4 所示加样（总体积 30 $\mu$ L）

表 4. 各反应孔加样示例

参考品	20 $\mu$ L qPCR Mix +10 $\mu$ L ST1/2/3/4/5/6
阴性对照	20 $\mu$ L qPCR Mix +10 $\mu$ L NTC/NCS
待测样品	20 $\mu$ L qPCR Mix +10 $\mu$ L 待测样本

4. 实验需使用 qPCR 实验专用的八联管或者 96 孔板进行反应，需去除反应体系中的气泡，并离心将液体离至管底准备反应。

5. 反应孔排版示例

表 5. 96 孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1	ST1							S1	S1	S1
B	ST2	ST2	ST2							S2	S2	S2
C	ST3	ST3	ST3							S3	S3	S3
D	ST4	ST4	ST4									
E	ST5	ST5	ST5									
F	ST6	ST6	ST6							ERC -S1	ERC -S1	ERC -S1
G					NTC	NTC	NTC			ERC -S2	ERC -S2	ERC -S2
H					NCS	NCS	NCS			ERC -S3	ERC -S3	ERC -S3

### 三、qPCR 反应程序和参数设置

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例。

1. 创建实验反应程序，设置两步法反应程序如下表

表 6. PCR 反应程序

Stage1	预变性	Reps:1	95 $^{\circ}$ C	30s
Stage2	循环反应	Reps:40	95 $^{\circ}$ C	5s
			56 $^{\circ}$ C	34s

备注：反应体积 30 $\mu$ L。程序中 56 $^{\circ}$ C 34s 处设置为荧光收集。其他型号的设备，如遇问题可咨我司或仪器厂家。

2. 创建实验反应板，点击 Select Fluorophores 选择荧光 FAM；在反应板图表中，选择样品孔，在 Sample Type 中下拉选择 Unknow，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 PG13-DNA；输入每个样品的重复次数及 Sample Name。（备注：如仪器要求设置猝灭基团与参比荧光：猝灭基团为 None，参比荧光为 ROX。）

3. 在反应板图表中，选择标曲孔，在 Sample Type 中下拉选择 Standard，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 PG13-DNA；输入每个稀释梯度的重复次数及 Sample Name。分别在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6 的 Concentration 一栏赋值为 3.00E+05、3.00E+04、3.00E+03、3.00E+02、3.00E+01、3.00E+00（单位为 fg/ $\mu$ L）。

4. 点击 Run 界面“Start Run”按钮进行 PCR 测定。

#### 四、qPCR 结果分析

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例

1. 点击资料分析视窗 Quantitation，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、扩增效率（Effect）、R<sup>2</sup>。
2. 在视窗 Quantitation Data 中，SQ Mean 一栏可读取无模板对照 NTC、NCS、待测样本的检测值，单位为 fg/μL。
3. 数据可靠性评估：
  - 三个平行孔间 Ct 值差应小于 1.0，Ct 值大于 35 的孔除外；
  - 阴性对照 NTC 和 NCS 的 CT 值都应大于标曲最低浓度的 CT 值或根据实验室自身验证结果设定标准；
  - 标准曲线线性相关系数 R<sup>2</sup> ≥ 0.98，扩增效率 85%~110% 之间；
  - ERC 回收率在 50%~150% 之间（加标回收率 = ERC / (0.9 \* 样品 + 0.1 \* ST3)）。

#### 注意事项

1. 本试剂盒已通过稳定性（冻融等因素）的验证，无需分装。
2. 阴性样品和阳性样品（参考品和待测样品等）的配制环境需区分区域，不可在一个区域内操作，配制人员需穿戴整齐，戴好口罩、手套和穿好洁净服。
3. 注意在不同加样步骤间及时更换吸头，避免交叉污染，避免长时开盖。
4. 试剂盒必须在有效期内使用。
5. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。
6. 只有严格遵守说明书的操作方法，全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。
7. 尽量在当天完成样本前处理纯化后立即进行后续 qPCR 检测，以保证检测结果的准确性。
8. 最终的试验结果与试剂的有效性、操作者的操作方法及试验环境密切相关。
9. 公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量，预留充足的样本。
10. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

#### 免责声明

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

